

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-191526

(P2000-191526A)

(43)公開日 平成12年7月11日(2000.7.11)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/35	6 0 2	A 6 1 K 31/35	6 0 2 4 B 0 1 8
31/00	6 1 9	31/00	6 1 9 D 4 B 0 2 0
			6 1 9 E 4 C 0 5 7
31/70	6 1 1	31/70	6 1 1 4 C 0 6 2
	6 1 3		6 1 3 4 C 0 8 6
審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 5 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願平10-370606

(22)出願日 平成10年12月25日(1998.12.25)

(71)出願人 594056524

株式会社丸美屋

熊本県熊本市御領町188-1

(72)発明者 山口 正義

静岡県静岡市瀬名川1丁目15番5号

(74)代理人 100082164

弁理士 小堀 益 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 骨形成促進及び抗骨粗鬆症組成物

(57)【要約】

【課題】 継続的に摂取して安全な骨成長や骨形成の促進効果を有する、骨粗鬆症や骨折などの予防及び治療に有効な食品や医薬品に使用することのできる組成物を提供する。

【解決手段】 骨形成促進及び骨粗鬆症予防の効果を有する組成物(大豆煮汁)は、その主たる有効成分として、サポニン、ダイジン、ダイゼイン、ゲニスチン及びゲニステインを含み、それぞれの単独成分よりも強い効果を得ることができる。

BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 サポニン、ダイジン、ダイゼイン、ゲニスチン及びゲニステインを主たる有効成分とすることを特徴とする骨形成促進及び抗骨粗鬆症組成物。

【請求項2】 サポニン、ダイジン、ダイゼイン、ゲニスチン及びゲニステインが大豆煮汁あるいは大豆や大豆胚軸由来である請求項1記載の組成物。

【請求項3】 固形物100g中のサポニン50mg以上、ダイジン50mg以上、ダイゼイン0.4mg以上、ゲニスチン40mg以上及びゲニステイン0.4mg以上である請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、骨有効成分としてサポニン、ダイジン、ダイゼイン、ゲニスチン及びゲニステインを共に含む、骨粗鬆症などの代謝性骨疾患や骨折などの予防及び治療に用いることができる骨成長及び骨形成促進並びに抗骨粗鬆症組成物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】高齢化に伴って骨量が減少し、骨粗鬆症が引き起こりやすくなる。骨粗鬆症は、骨量の減少により、骨折しやすくなる骨の病気であり、近年、国内外を通じて多くの関心が持たれている。そのため、骨粗鬆症は治療よりも予防することが重要な疾患と位置づけられている。

【0003】骨粗鬆症の治療薬としては、カルシウム、活性型ビタミンD<sub>3</sub>、エストロゲン、カルシトニン、イソフラボン、ビタミンK<sub>2</sub>及びビスホスホネート関連化合物が用いられている。これらの薬物の作用は、骨組織から骨塩を溶解するときに機能する破骨細胞の働きを抑制することを主な作用としている。現在、開発中の骨粗鬆症治療薬は、上記関連化合物の誘導体である。これら薬物の使用は高価となり、骨粗鬆症と診断されて使用が可能になるため、骨粗鬆症を予防することが不可能であり、骨粗鬆症を予防できる食品素材が求められている。

【0004】骨粗鬆症の予防のために、若年期から骨量を増やすことが不可欠で、日常的に骨成長及び骨形成に必要な栄養成分や、骨形成を促進する食品を積極的に摂取することが極めて重要であることが認識されるようになった。骨を強化する食品としては、現在、主にカルシウムやビタミンDが利用されている。また、カルシウムの腸管からの吸収を促進するカゼインホスホペプチドなども利用されている。更に、側鎖長の違いによりメナキノン(MK)-1～14として知られている食品中ビタミンK<sub>2</sub>を利用することも考えられている。最近では、ゲニスチンなどのイソフラボノイドが利用されようとしている。しかしながら、これらの物質を骨粗鬆症の予防のために利用するには、多量を食品中に単独添加し強化

することが必要となり、食品の素材となり得ないため、食品の機能性を高めても、その嗜好性を低下させるなどの問題がある。現在、骨粗鬆症を予防することを目的とした適当な食品素材は開発されていない。

【0005】大豆種子は、イソフラボン成分を多く含んでいる。イソフラボンには、ダイジン、ゲニスチン、グリシチンとそれらにマロニル基が結合したものや、それらから糖がとれたダイゼインやゲニステインが存在している。近年、これらの成分の一部に、抗骨粗鬆症や女性ホルモン活性などの生物学的作用が報告され注目を集めている。一方、イソフラボンが抗骨粗鬆症活性があることについての報告は散見されるが、主に、ダイゼインやゲニステインを単品として用いたものである(Yamaguchi M, Gao YH: Res. Exp. Med., 197:101-107, 1997; Yamaguchi M, Gao YH: Mol. Cell. Biochem., 178:377-382, 1998; Yamaguchi M, Gao YH: Biochem. Pharmacol., 55:71-76, 1998)。一方、大豆やその胚軸中には、サポニン、ダイジン、ダイゼイン、ゲニスチン並びにゲニステインが高含有している。更に大豆からの納豆製造過程で多量に生じる煮汁中には上記成分が高濃度に含有しており、この組成物は各々の単独成分よりも効果的な高い機能性を有すると考えられるが、その知見は報告されていない。また一方、大豆煮汁や大豆胚軸は食品として利用されておらず、主に廃棄されている。これらに抗骨粗鬆症作用などの機能性を見出すことができれば、機能性食品として再利用することができる。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】骨粗鬆症の予防においては、その予防のための食品の摂取は長期にわたるために安全性に優れることが絶対的に必要となる。従来用いられているカルシウム、イソフラボンやビタミンK<sub>2</sub>などを食品に添加及び強化することについては、今日、その安全性の面における知見が得られておらず、将来多くの問題が生じる可能性が高い。しかしながら、大豆食品中から生成する煮汁や胚軸は、天然食品素材であり、伝統的生生活の経験から安全性が保障されている。そのため長期間にわたっての摂取は骨量の増加や骨粗鬆症の予防のために極めて有効性が高い。この煮汁の骨量増加作用や抗骨粗鬆症効果などの機能性については、これまでに知られておらず、煮汁素材を用いた機能性食品の開発もなされていない。本発明は、大豆煮汁の骨成長や骨形成促進並びに抗骨粗鬆症の予防と治療を目的とした食品組成物を得ることを目的としている。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】この発明の骨成長並びに骨形成促進及び骨量減少防止効果を有する大豆煮汁の組成物は、サポニン、ダイジン、ダイゼイン、ゲニスチン

ン、並びにゲニステインを有効成分として含まれることを特徴とする。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明者は、骨代謝に影響を及ぼす食品成分に関して鋭意研究の結果、大豆煮汁組成物が骨成分を増強させることを見出し、本発明を完成させたものである。本発明の組成物の作用及び効果は、4週齢の幼若ラットに、本発明の煮汁液を経口投与し、ラットの大腿骨の骨幹部及び骨幹端部組織の骨成分の変動を調べることによって明らかにされた。すなわち、煮汁懸濁液をラットに経口投与すると骨組織中の骨塩量としてのカルシウム量、骨石灰化促進酵素アルカリ性ホスファターゼ活性、並びに骨組織中の細胞数の指標としてのDNA量を測定した結果、これらの全ての骨成分量が、有意に上昇することを見出した。この結果から、本発明の煮汁組成物は、骨成長並びに骨形成促進作用に基づく抗骨粗鬆症作用を有し、骨塩量の減少を防止し得る作用を有しており、骨粗鬆症や骨折の予防に有用であることが期待された。

【0009】＜実験例＞以下の実験例によって、本発明を更に詳細に説明する。

＜実験方法の説明＞幼若な雄性ウイスター系ラット6匹を1群として用いた。納豆製造過程で生成する煮汁乾燥粉末を精製蒸留水に懸濁し、100mg/mlの試験溶液を調製した。煮汁乾燥粉末中には、サポニン(66mg)、ダイジン(77mg)、ダイゼイン(0.6mg)、ゲニステイン(58mg)及びゲニステイン(0.6mg)を含有していた。この試験溶液をラットの体重100g当り100mg/mlを胃ゾンデで経口投与した。投与は1日2回(午前10時と午後4時)14日間行なった。最終投与の24時間後に、ラットはと殺し、大腿骨を摘出した。対照群には、精製蒸留水を1ml/100g体重を経口投与した。摘出した大腿骨は骨幹部(皮質骨)と骨幹端部(海綿骨)に分け、骨成分の測定に使用した。

【0010】骨組織中カルシウム量の測定

大腿骨の骨幹部組織と骨幹端部組織を0.25Mショ糖溶液中で軽く洗浄し、100℃で約6時間乾燥器中で乾燥した。その乾燥重量を測定した後、試験管に入れ、濃硝酸3mlを添加して、24時間120℃で分解した。これを試料液として、カルシウム量を原子吸光度計で定量した。カルシウム量は、骨乾燥重量1g当りのmgとして表示した。

【0011】骨アルカリ性ホスファターゼ活性の測定

大腿骨の骨幹部組織と骨幹端部組織を冷0.25Mショ糖溶液で洗浄後、冷6.5mMバルビタール緩衝液(pH7.4)3ml中で破碎し、60秒間の超音波処理をした。更に3000回転/分で5分間遠心処理し、その上清画分を粗酵素溶液として用いた。骨アルカリ性ホスファターゼ活性は、Walter及びSchuttの方

法(Bergmeyer HU(ed). Method of Enzymatic analysis, Vol. 1-2, Academic Press, New York, pp856-860, 1965)に従って測定した。酵素反応は、基質としてp-ニトロフェニルリン酸ニナトリウムを含む0.1Mジェタノールアミン塩酸緩衝液(pH9.8)2mlに酵素溶液0.05mlを加えることにより反応を開始させた。反応は、37℃、30分間インキュベーションすることにより行なった。0.05N NaOH 10mlを加えることにより、反応を停止させ、遊離したp-ニトロフェノール量(nmol)を分光光度計(405nm)で測定した。酵素活性は、インキュベーションの1分間の反応で生成したp-ニトロフェノール量(nmol)を、使用した酵素蛋白質量(mg)当りで表示した。蛋白質の濃度はLowryらの方法(J. Biol. Chem., 193:265-273, 1951)に準じて測定した。

【0012】骨組織中のデオキシリボ核酸(DNA)量の測定

大腿骨の骨幹部組織と骨幹端部組織を冷0.25Mショ糖液で洗浄し、水分除去後、湿重量を測定した。これを0.1N NaOH 4.0ml中で破碎し、4℃、24時間振とう、抽出した。その後、3000回転/分で5分間遠心処理し、その上清画分をDNA測定用試料とした。DNA量の測定は、Ceriottiの方法(J. Biol. Chem., 214:39-77, 1955)に従って行なった。試料2.0mlに濃塩酸1.0ml及び0.04%インドール溶液1.0mlを加え、試験管にアルミキャップを被せ、沸騰水浴中で10分間加熱した後、氷中で急冷することによって反応を停止させた。クロロホルム4.0mlで3~4分間の抽出を数回繰返し、分光光度計(490nm)でDNA量を測定した。DNA量(mg)は、骨組織湿重量(g)当りで計算した。

【0013】統計処理法

各々の測定値の有意差検定は、Student's t-testを用いて行なった。危険率5%以下のものを有意差有りとした。

【0014】実験結果の説明

納豆製造過程で生成する煮汁乾燥粉末を懸濁した試料液(100mg煮汁/ml)をラットに体重100g当り1mlを2週間経口投与したときの大腿骨の骨幹部組織と骨幹端部組織の骨成分の変動について調べた。結果を表1に示す。骨幹部組織中のカルシウム量並びにDNA量は煮汁投与により有意に増加した。また更に、骨幹端部組織中のカルシウム量、アルカリ性ホスファターゼ活性及びDNA量は煮汁投与により有意に増大した。この結果から、サポニン(66μg/ml)、ダイジン(77μg/ml)、ダイゼイン(0.6μg/ml)、ゲニステイン(58μg/ml)及びゲニステイン

(0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含有する煮汁組成物が、骨形成促進による骨成長や老化に伴う骨代謝活性の減弱による骨増量の減少を防止し得る有効な組成をもつ食品素材であることが判明した。なお、煮汁組成物と等濃度のサポニン(66  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、ダイズイン(77  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、ダイゼイン(0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )並びにゲニステイン(0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )をそれぞれ単独に経口投与した場合には、上記骨成分の有意な増加は認められなかった\*

※た。このことから、煮汁経口投与による骨成分の増加効果は、上記成分の複合的相乗効果に基づくことが判明した。これにより、老化性骨粗鬆症の発症を煮汁組成物の摂取により予防できる可能性を開いたものである。

【0015】

【表1】ラット大腿骨骨組織中の骨成分の煮汁経口投与による増量

骨成分	対照群	煮汁投与群
骨幹部組織 カルシウム(mg/g 乾燥重量)	251.1 $\pm$ 11.5	294.9 $\pm$ 8.6*
アルカリ性ホスファターゼ活性 (n mol/min/mg 蛋白質)	1537.9 $\pm$ 81.1	1934.1 $\pm$ 87.3*
DNA (mg/g 湿重量)	1.886 $\pm$ 0.048	2.259 $\pm$ 0.039*
骨幹端部 カルシウム(mg/g 乾燥重量)	223.0 $\pm$ 6.6	253.1 $\pm$ 7.3*
アルカリ性ホスファターゼ活性 (n mol/min/mg 蛋白質)	1410.5 $\pm$ 97.1	2078.1 $\pm$ 61.4*
DNA (mg/g 湿重量)	3.219 $\pm$ 0.042	3.493 $\pm$ 0.014*

各値は、6匹のラットの骨組織の平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。

【0016】本発明の組成物を含有する食品素材は、副作用が全くない抗骨粗鬆症効果を有することから、若い時期から日常的に骨粗鬆症の予防を目的に摂取することができるため、個人の老後の生活の質を守るだけでなく、高齢化社会の医療費削減への貢献が期待できる。同時に、本発明により提供できる組成物をもった食品素材は、栄養成分の強化も行なうことができる。

【0017】安全性試験

実施例で調製した粉末試料液の急性毒性試験を以下の方法で行なった。

<試験方法>4週齢のウイスター系雄性ラットを1群1

0匹使用した。被検物質の投与が個体体重に対して1g※

※/100g体重及び10g/100gの2群を編成し、

18時間絶食後、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

ラットは恒温恒湿の条件で飼育し、投与日を0として各個体の体重を測定しつつ、14日間一般症状及び生死の状態を観察した。この間、水と餌は自由に与えた。

【0018】<試験結果>粉末試料液の投与は、死亡例は認められず、体重も順調に増加した。また、外観も通常のラットと何ら変わりなかった。したがって、被検

物質ともLD50は10g/100gより大きく、極めて安全な組成物であることがわかった。また、本試料液は天然食品成分をもった素材であることから慢性毒性に関しても極めて安全性の高い素材であると判断される。

【0019】

【実施例】

実施例1 粉末素材

大豆煮汁乾燥粉末(サポニン 66mg/100g、ダイジン 77mg/100g、ダイゼイン 0.6mg/100g、ゲニステイン 58mg/100g、ゲニステイン 0.6mg/100g) . . . . . 700g  
トウモロコシデンプン . . . . . 280g  
抽出トコフェロール . . . . . 20g

上記原料を高速ミキサーにて混合して均一な粉末が得られた。この粉末は様々な食品に混合可能である。★

★【0020】

実施例2 錠剤

大豆煮汁乾燥粉末(実施例1と同様の成分を含む) . . . . 100g  
トウモロコシデンプン . . . . 125g  
結晶セルロース . . . . 25g

上記成分を均一に混合して、7.5%ヒドロキシビロピルセルロース水溶液200mlを加え、押出し造粒機により、直径0.5mmスクリーンを用いて顆粒とし、直

ちにエルメライザーにより丸めた後、乾燥して顆粒剤とした。

50 【0021】大豆煮汁及び胚軸の乾燥方法及適用の範囲

大豆食品加工時に発生する胚軸や煮汁は、直ちに乾燥して水分を飛ばさないと、腐敗微生物等が増殖し、成分組成が変化してしまう。乾燥方法としては、通常食品の乾燥に用いる手法の全てについて適用することができる。

【0022】

【発明の効果】大豆食品加工中に生成する胚軸や煮汁（サポニン、ダイズイン、ダイゼイン、ゲニスチン及びゲニステインを含有）を食品素材とした組成物は、強い骨成長並びに骨形成促進効果及び骨塩量増加効果を有 \*

\*し、健康食品として摂取しやすい顆粒剤として服用することができるのみならず、日常的に食する食品として違和感なく容易に摂取できるので、高齢者の骨粗鬆症の治療及び予防に特に有用であり、若年層においても、食生活の偏重により生じる骨成長や骨形成の遅延を予防するのに高い効果を奏する。更に、骨形成や骨代謝の異常によって生じる骨折、骨軟化症、骨粗鬆症、リュウマチ性骨減少症や腰背痛の予防食品や医薬品として有用である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターマコード (参考)
A 6 1 K 35/78		A 6 1 K 35/78	J 4 C 0 8 8
// A 2 3 L 1/20		A 2 3 L 1/20	A
1/30		1/30	B
C 0 7 D 311/36		C 0 7 D 311/36	
C 0 7 H 15/256		C 0 7 H 15/256	Z
17/07		17/07	

F ターム (参考) 4B018 LE01 LE03 MD58 ME05 MF04  
MF06 MF08  
4B020 LB24 LB30 LC05 LC08 LG01  
LK05 LP04 LP20  
4C057 BB02 JJ52 KK08  
4C062 EE43  
4C086 AA01 AA02 BA08 EA11 MA01  
ZA96 ZA97  
4C088 AB61 AC04 CA05 NA06 NA07  
ZA96 ZA97

BEST AVAILABLE COPY